



Rec'd PCT/PTO 06 JAN 2005
Mod. C.E. - 1-4-7

PCT/IT 03 / 00424

10/520401

Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2



Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: INV. IND:

N. RM2002A000365 DEL 08.07.2002

REC'D 07 OCT 2003

WIPO

PCT

*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Roma, il 20 AGO. 2003

IL DIRIGENTE

[Signature]

DE POMO SALUZZA

BEST AVAILABLE COPY

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE - DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

A. RICHIEDENTE(I)

1) Denominazione UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "LA SAPIENZA" N.G. EIN
 Residenza Roma, RM codice 02133771002
 2) Denominazione CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE EIN
 Residenza Roma, RM codice 00962421004

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

Cognome e nome CAPASSO Olga ed altri Cod. fiscale
 Denominazione studio di appartenenza Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.
 Via Piemonte n. 26 città ROMA Cap 00187 (prov) RM

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

Via Piemonte n. 26 città ROMA Cap 00187 (prov) RM

D. TITOLO

classe proposta (sez./cl./scl) Gruppo/sottogruppo

"Purificazione, clonazione e caratterizzazione biochimica di XendoU, l'attività endoribonucleolitica coinvolta nella biosintesi, splicing-indipendente, dei piccoli RNA nucleolari in *Xenopus laevis*".

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒ SE ISTANZA: DATA / / N° PROTOCOLLO

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome e nome

cognome e nome

1) BOZZONI Irene
 2) CAFFARELLI Elisa

3) LANEVE Pietro
 4)

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

Tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

Allegato S/R

1) / /
 2) / /

SCIOGLIMENTO RISERVE

Data

N. Protocollo

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

001 - I Titolari partecipano ai diritti sul brevetto nelle seguenti misure:

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "LA SAPIENZA": 66%

CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE: 34%

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) 2 n. pag. 2 7

riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)

Doc. 2) 2 PROV n. tav. 1 3

Disegno

Doc. 3) 1

Lettera d'incarico (dell'UNIVERSITA' DI ROMA ...)

Doc. 4) 1

designazione inventore

Doc. 5)

documenti di priorità con traduzione in italiano

Doc. 6) 0 RIS

Lettera d'incarico (del CONSIGLIO NAZIONALE ...)

Doc. 7)

nominativo completo del richiedente

8) attestati di versamento, totale Euro DUECENTONOVANTUNO /8

Obbligatorio

COMPILATO IL 08 / 07 / 2002

FIRMA DEL(I)

RICHIEDENTE(I)

CONTINUA S/NO NOIng. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA S/NO SÌ

CAMERA di COMMERCIO, IND. ART. e AGR. -

RM 2002 A 000365

ROMA

codice 58VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA

Reg. A

L'anno DUEMILADUEil giorno OTTO

del mese di

LUGLIOIl(I) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 00 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraindicato.

ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE



L'UFFICIALE ROGANTE

L'Ufficiale RoganteSilvia Aulenti

RM 2002 A 000365

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE

PROSPETTO A

NUMERO DOMANDA

REG. A

DATA DI DEPOSITO 08/07/2002

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILAS

A. RICHIEDENTE(I)

1) Denominazione

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "LA SAPIENZA"

2) Denominazione

CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE

D. TITOLO

"Purificazione, clonazione e caratterizzazione biochimica di XendoU, l'attivita' endoribonucleolitica coinvolta nella biosintesi, splicing-indipendente, dei piccoli RNA nucleolari in *Xenopus laevis*".

Classe proposta (sez./cl./scl/)

(gruppo/sottogruppo)

L. RIASSUNTO

E' descritta la clonazione e la caratterizzazione del gene per una attivita' RNA-sica endonucleolitica Mn⁺⁺ dipendente, in grado di generare estremita' 5' OH e 2'3' fosfato ciclici.

M. DISEGNO



DESCRIZIONE

a corredo di una domanda di brevetto per invenzione industriale avente per titolo: "Purificazione, clonazione e caratterizzazione biochimica di XendoU, l'attività endoribonucleolitica coinvolta nella biosintesi, splicing-indipendente, dei piccoli RNA nucleolari in *Xenopus laevis*"

Titolare: UNIVERSITÀ DEGLI STUDI ROMA "LA SAPIENZA" (66%)

CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE (34%)

Inventori: Irene Bozzoni, Elisa Caffarelli, Pietro Laneve

Le endoribonucleasi giocano un ruolo essenziale nel metabolismo del RNA, partecipando sia ai processi degradativi, come l'eliminazione degli mRNA (Schoenberg and Chernokalskaya, 1997), che a quelli maturativi, per generare molecole di RNA funzionali dai trascritti primari. Solo poche endoribonucleasi sono state isolate in organismi eucarioti, la maggior parte delle quali è coinvolta nella biosintesi di componenti dell'apparato di traduzione. Tra esse vi sono enzimi ribonucleoproteici, come la RNasi P e la RNasi MRP, che funzionano come endoribonucleasi sito-specifiche: la RNasi P è coinvolta nella generazione delle estremità 5' dei tRNA (Nashimoto, 1995), mentre la RNasi MRP è coinvolta nel processamento dei pre-rRNA (Lygerou *et al.*, 1996). Altre attività endonucleolitiche, come la 3'-tRNasi, l'endonucleasi per lo splicing dei tRNA e i membri della famiglia della RNasi III (Trotta *et al.*, 1997; Bujnicki and Rychlewski, 2000; Zamore, 2001) sono enzimi proteici. La 3'-tRNasi è una endoribonucleasi eucariotica spermidina-dipendente che rimuove in

ING. BARZANO & ZANARDI ROMA SPA

maniera precisa la coda all'estremità 3' dai precursori di tRNA (Castano *et al.*, 1985; Nashimoto, 1995). Le endoribonucleasi per lo splicing dei tRNA sono richieste per la rimozione di introni dai pre-tRNA: è un enzima Mg^{++} -dipendente e taglia i pre-tRNA ai siti di splicing al 5' e 3', rilasciando prodotti con estremità 2'-3' fosfato ciclico e 5'OH (Peebles *et al.*, 1983). Le RNasi III sono endoribonucleasi che agiscono su RNA a doppia elica, presenti in batteri e in eucarioti: sono state isolate per la prima volta in *E.coli* (Court, 1993; Nicholson, 1997), e successivamente ortologi eucarioti sono stati identificati per similarità di sequenza. La Rnasi III da *S.cerevisiae*, (Rnt1p), è coinvolta in diversi eventi biosintetici come il processamento dei pre-rRNA, snRNA e snoRNA (Elela *et al.*, 1996; Kufel *et al.*, 1999; Chanfreau *et al.*, 1997; Allmang *et al.*, 1999; Chanfreau *et al.*, 1998). Recentemente è stato dimostrato che Rnt1p è anche coinvolta nel rilascio degli snoRNA intronici, U18 e snR38 dai loro pre-mRNA (Giorgi *et al.*, 2001). Inoltre, un nuovo membro della famiglia delle RNasi III eucariotiche, denominata "Dicer", è stata identificata nei metazoi (Bernstein *et al.*, 2001). Essa è coinvolta nel meccanismo di interferenza (RNAi), generando piccoli RNA interferenti di 21-23 nt (siRNAs) da più lunghi precursori parzialmente a doppia elica. Questi prodotti di processamento agiscono nella regolazione genica mediata da RNA (Ambros, 2001). Il taglio da parte delle Rnasi III rilascia estremità 3'OH e 5' fosfato ed è Mg^{++} -dipendente.

Gli autori dell'invenzione hanno già dimostrato che un'attività endoribonucleolitica gioca un ruolo essenziale nella biosintesi dello

snoRNA C/D box U16, codificato nel terzo introne del gene per la proteina ribosomale L4 in *X.laevis* (Caffarelli *et al.*, 1994). Gli autori hanno già mostrato come il processamento di U16 dall'introne ospite è alternativo alla reazione di splicing: conseguentemente, la sintesi del mRNA per L4 è alternativo alla produzione dello snoRNA U16 (Caffarelli *et al.*, 1996). In questo contesto, il meccanismo biosintetico di U16, per se, regola l'espressione del gene L4 a livello post-trascrizionale.

Gli autori hanno ora purificato all'omogeneità, da estratti nucleari di oociti di *X.laevis* (ONE), e caratterizzato l'attività endonucleolitica (XendoU) responsabile per il processamento del snoRNA U16 dal suo introne ospite. Il parziale sequenziamento della proteina ha permesso agli autori di clonare il cDNA per XendoU, di esprimerlo e di analizzare le caratteristiche dell'enzima. La proteina rappresenta un'attività endoribonucleasica nuova, essendo: i) poli-U specifica, ii) Mn^{++} -dipendente e iii) rilascia come prodotti di taglio estremità 5' OH e 2'-3'fosfato ciclici.

Forma pertanto oggetto della presente invenzione un acido nucleico codificante una proteina ad attività endoribonucleasica che sia specifica per sequenze poliU, dipendente da ioni Mn^{++} , e che rilasci come prodotti del taglio molecole di RNA con estremità 5' OH e 2'-3' fosfato ciclici. Preferibilmente l'acido nucleico comprende sostanzialmente la sequenza nucleotidica della fig. 4, o omologhi funzionali di essa o una sequenza complementare ad essa.

E' ulteriore oggetto dell'invenzione un vettore ricombinante in grado di esprimere in maniera efficace in procarioti l'acido nucleico dell'invenzione.

E' ulteriore oggetto dell'invenzione un vettore ricombinante in grado di esprimere in maniera efficace in eucarioti l'acido nucleico dell'invenzione.

L'esperto del settore individuerà i vettori più opportuni anche tenendo conto dell'organismo ospite per esprimere l'acido nucleico dell'invenzione.

Forma ulteriore oggetto dell'invenzione una proteina ad attività endoribonucleasica che sia specifica per sequenze poli U, dipendente da ioni Mn^{++} , e che rilasci come prodotti del taglio molecole di RNA con estremità 5' OH e 2'-3' fosfato ciclici, o porzioni funzionali di essa. Preferibilmente la proteina è codificata dall'acido nucleico dell'invenzione, più preferibilmente la proteina ha sostanzialmente la sequenza amminoacidica di Fig.4. La proteina è vantaggiosamente prodotta per via sintetica o ricombinante con le metodiche note agli esperti del settore.

L'invenzione verrà ora descritta in maniera non limitativa, in riferimento a procedure sperimentali, in cui verranno citate le seguenti figure:

Fig. 1 Saggio di attività e purificazione di XendoU. A, rappresentazione schematica del processamento del snoRNA U16. P indica il precursore contenente U16 (003 RNA); I-1a e I-1b rappresentano i prodotti generati dal taglio a monte di U16, mentre I-2a

ING. BARZANO & ZANARDI ROMA SPA



e I-2b le loro molecole complementari; I-3 è il prodotto originato dal taglio a valle di U16, mentre I-4 la rispettiva molecola complementare; pre-U16 rappresenta il precursore di U16 con le sequenze fiancheggianti aggiuntive al 5' e 3'. La struttura Cap è mostrata come un punto nero, gli esoni come riquadri, l'introne come linea continua e la regione codificante per lo snoRNA U16 come una linea più spessa. Le frecce grandi localizzano i siti principali di taglio e le frecce piccole quelli minori. B, processamento *in vitro* di U16 in estratti nucleari non frazionati di oociti (ONE) e con XendoU purificata (XendoU). L'RNA 003 marcato con ^{32}P era incubato per i tempi sottoindicati di seguito; l'RNA era poi estratto e separato su un gel di poliacrilammide 6% 7M urea. I prodotti di taglio specifici sono indicati di lato. C, schema della procedura utilizzata per la purificazione di XendoU da ONE. D, proteine da frazioni attive durante la purificazione erano separate su SDS-PAGE e visualizzate per colorazione Blue Coomassie. I numeri al di sotto si riferiscono ai corrispondenti passaggi di purificazione schematizzati nel pannello C. La freccia indica l'enzima purificato con un peso molecolare apparente di 37 kDa.

Fig. 2 Il taglio con XendoU richiede cationi Mn^{++} . L'RNA 003 marcato con ^{32}P è stato incubato in estratto nucleare di oociti (ONE) o con XendoU purificata (XendoU) in presenza di diversi ioni metallici ad una concentrazione di 6 mM. Dopo 30 min, la reazione era bloccata e i prodotti di processamento analizzati su gel di poliacrilammide 6% 7M urea. Nella colonna —, l'RNA substrato era incubato con XendoU in

assenza di ioni. I prodotti di taglio specifici sono schematizzati sul lato sinistro.

Fig. 3 XendoU è U-specifica e produce fosfato 2'-3' ciclico. A, L'oligoribonucleotide sintetico P1 marcato con ^{32}P ATP, contenente il sito di taglio distale a monte di U16, e i mutanti da esso derivati (P2, P3) erano incubati con l'estratto non frazionato (colonne 2) o con XendoU purificato (colonne 3), in condizioni standard per 30 min. Le molecole di RNA erano estratte e analizzate su gel 10% poliacrilammide 7M urea. Nelle colonne 1 è mostrato l'RNA non trattato, nella colonna M il marker ad RNA generato da digestione alcalina di P1; le frecce indicano i siti di taglio. Sul lato destro sono riportate le sequenze degli oligoribonucleotidi. B, Le molecole I-1 marcate con ^{32}P , schematicamente rappresentate sul lato sinistro, generate per incubazione del precursore contenente U16 in ONE (ONE), con XendoU purificata (XendoU) o dopo iniezione in oociti (*in vivo*), sono state purificate su gel e le loro estremità 3' analizzate. Le molecole sono state incubate con 1 unità di fosfatasi alcalina (colonne 1) o con 10mM HCl (colonne 2) o con fosfatasi alcalina dopo trattamento acido (colonne 3). Dopo incubazione, gli RNA estratti sono stati analizzati per elettroforesi su gel 10% poliacrilammide 7M urea. Le molecole non trattate erano corse come controllo nelle colonne 4.

Fig. 4 cDNA e sequenza amminoacidica di XendoU. I nucleotidi delle regioni non tradotte al 5' e 3' sono mostrati in lettere minuscole, i nucleotidi della ORF a lettere maiuscole. Al di sopra di ciascun codone è mostrato l'amminoacido corrispondente. Le porzioni di sequenza

determinate da degradazione secondo Edman automatizzata ed esperimenti di mappaggio di massa (si vedano "Procedure sperimentali") sono indicati dai numeri 1, 2 e 3. Il codone di stop è identificato con un asterisco. I numeri sul lato destro del diagramma corrispondono ai residui amminoacidici. Sono sottolineate le sequenze di amminoacidi identificate da esperimenti di mappaggio MALDI.

Fig. 5 Analisi funzionale di XendoU tradotto *in vitro*. A, analisi SDS-PAGE di XendoU marcata con [^{35}S] Metionina (colonna 2) e luciferasi di controllo (colonna 1) prodotta da trascrizione e traduzione *in vitro*. La freccia indica la proteina XendoU. B, RNA 003 era incubato, in presenza di ioni Mn^{++} , in ONE (ONE), con XendoU prodotto da lisato di reticolociti (ret-XendoU/+Mn), o con lisato di reticolociti come tale (ret/+Mn). Come controllo l'RNA 003 era incubato, in assenza di ioni Mn^{++} , con XendoU prodotta da lisato di reticolociti (ret-XendoU/-Mn). I numeri sottostanti indicano i tempi di incubazione: 0 min (colonna 1), 45 min (colonne 2).

Fig. 6 XendoU è coinvolta nella biosintesi dello snoRNA U86. A, il processamento di U86 è analizzato *in vivo* per iniezione del precursore contenente U86 marcato con ^{32}P (P) in oociti di *X. laevis* (colonne *in vivo*), o *in vitro* per incubazione dell'RNA precursore in ONE (ONE), o con XendoU purificata (XendoU). I numeri di sotto indicano diversi tempi di incubazione: 0 min (colonna 1), 10 min (colonne 2), 45 min (colonne 3), 3 hr (colonne 4), 16 hr (colonne 5). L'RNA era poi estratto e caricato su gel 6% poliacrilammide 7M urea. I prodotti del processamento sono schematizzati a lato. Le frecce indicano i tagli

specifici di XendoU. B, L'innescò UHindIII marcato con ^{32}P , indicato al di sotto, era fatto reagire con molecole non marcate I-4 ottenute dopo 10 min di incubazione in oociti (colonna *in vivo*), 45 min di incubazione in ONE (ONE) o 45 min di incubazione con XendoU purificata (XendoU). I prodotti dell'estensione dell'innescò erano corsi in parallelo con la sequenza (colonne G, A, T e C), ottenuta con lo stesso oligonucleotide sul precursore contenente U86. La sequenza è riportata sul lato sinistro: la freccia indica i siti di taglio di XendoU. C, il precursore contenente U86 era incubato, in presenza di ioni Mn^{++} , in ONE (ONE), con XendoU prodotta da lisato di reticolociti (ret-XendoU/+Mn), o con lisato di reticolociti come tale (ret/+Mn). Come controllo, il pre-mRNA era incubato con XendoU prodotta da lisato di reticolociti in assenza di ioni Mn^{++} (ret-XendoU/-Mn). I numeri di sotto indicano i tempi di incubazione: 0 min (colonna 1), 45 min (colonne 2).

Procedure Sperimentali

Isolamento massivo di vescicole germinali di oociti e preparazione dell'estratto nucleare

Le vescicole germinali di *X. laevis* erano isolate con la procedura di Gandini-Attardi et al. (Gandini-Attardi et al., 1990) e gli estratti nucleari erano preparati come descritto (Caffarelli et al., 1994).

Purificazione dell'attività XendoU

XendoU era purificata da estratti nucleari di oociti (ONE). ONE era frazionato per precipitazione con solfato di ammonio. Solfato di ammonio solido (280 mg/ml) era aggiunto lentamente all'estratto nucleare fino al 45% di saturazione e la sospensione era agitata per

ING. CARZANO & ZARAGO ROTA SpA



30' a 4°C e poi centrifugata a 12.000 rpm per 30' a 4°C. Il sovrantante era portato al 70% di saturazione per ulteriore aggiunta di solfato di ammonio (240 mg/ml). La sospensione era agitata e centrifugata come sopra. Il pellet risultante era disciolto in tampone ONE (25 mM Hepes pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% glicerolo) e poi applicata su colonna di idrossiapatite (CHT-II Econocolumn, Biorad). La colonna era lavata con tampone ONE e poi eluita con 5 volumi di colonna di 100 mM Na-fosfato pH 7 in tampone ONE. L'eluato era raccolto in frazioni da 1ml, poi saggiate per attività endonucleasica. Le frazioni selezionate erano riunite, diluite con 3 volumi di tampone ONE e applicate su una colonna Blue Sepharose (Blue Sepharose Fast Flow Pharmacia). La colonna era lavata con tampone ONE e poi eluita con 5 volumi di colonna di 0.2 M NaCl in tampone ONE. L'eluato era poi raccolto in frazioni da 1ml; quelle con attività specifica erano riunite e dializzate contro tampone ONE. La miscela proteica era sottoposta ad un secondo frazionamento su colonna di idrossiapatite. L'eluizione era effettuata con 10 volumi di colonna di un gradiente lineare 0-100 mM Na-fosfato pH 7 in tampone ONE. Le frazioni raccolte erano saggiate e quelle con attività riunite e concentrate mediante ultrafiltrazione (Centricon C10, Millipore). Le frazioni concentrate erano poi applicate su una colonna di gel-filtrazione (Pharmacia) già equilibrata in tampone ONE. L'eluizione era monitorata raccogliendo frazioni da 0.5 ml che erano poi saggiate per l'attività specifica.

Considerando la resa della proteina purificata, si può assumere che XendoU rappresenta non più di 1/1000 della massa proteica

presente nell'estratto nucleare. Per ottenere proteina in quantità sufficiente per la sequenza e la caratterizzazione, la procedura descritta è stata effettuata su diversi campioni di 15-20 ml di ONE, raccogliendo insieme le frazioni finali purificate.

Preparazione e isolamento dei peptidi triptici

Le bande proteiche da analisi SDS-PAGE (5 µg) colorate con Coomassie Blue R250 erano excise, ridotte con ditioneitolio e carbossiamidometilate. I pezzi di gel erano equilibrati in 25 mM NH_4HCO_3 , pH 8 e poi digeriti *in situ* con tripsina a 37°C per 18 hr. I peptidi erano estratti per sonicazione con 100 µl di 25 mM NH_4HCO_3 /acetonitrile 1:1 v/v, pH 8 (due volte). La miscela di peptidi era frazionata per HPLC in fase inversa su una colonna Vydac C₁₈ 218TP52 (250 x 1 mm), 5 µm, 300 Å diam. pori (The Separation Group, USA) usando un gradiente lineare da 5% a 60% di acetonitrile in 0.1% TFA per 60 min, ad una velocità di flusso di 90 µl/min. I componenti individuali erano raccolti manualmente e liofilizzati.

Sequenza dei peptidi e analisi per spettrometria di massa

L'analisi della sequenza era effettuata con un sequenziatore di proteine Procise 491 (Applied Biosystems, USA), equipaggiato con un apparato per microgradiente 140C, e un rivelatore di UV a 785A (Applied Biosystems, USA) per l'identificazione automatizzata di PTH-amminoacidi.

Gli spettri di massa con ionizzazione mediante desorbimento laser assistito da matrice erano registrati con uno spettrometro di massa Voyager DE-PRO (Applied Biosystems, USA); una miscela analitica

contenente acido α -ciano-4-idrossi-cinnamico era aggiunta alla piastra campione e lasciata essiccare. La calibrazione della massa era effettuata usando gli ioni molecolari da peptidi prodotti per autoproteolisi triptica e la matrice come standard interni.

Sintesi di RNA *in vitro* e microiniezione in oociti

Il precursore contenente U16 (RNA 003), comprendente il terzo introne del gene per la r-proteina L4 di *X. laevis*, era trascritto dal plasmide 003 digerito con HindIII (Caffarelli *et al.*, 1994). Il precursore contenente U86 era ottenuto come già descritto (Filippini *et al.*, 2001). Le reazioni di trascrizione *in vitro* erano effettuate in presenza di (32 P) α -UTP come descritto (Caffarelli *et al.*, 1998) e i pre-mRNA erano iniettati in nuclei di oociti allo stadio VI come descritto (Caffarelli *et al.*, 1994).

Reazioni di processamento *in vitro*

Saggio ONE: descritto in (Caffarelli *et al.*, 1994).

Saggio XendoU: la miscela di reazione (25 μ l) conteneva 3×10^4 cpm di pre-mRNA marcato con (32 P), 6 mM $MnCl_2$, 50 mM NaCl, 25 mM HEPES pH 7.5, 1 mM DTT, 10 μ g di tRNA di *E. Coli*, 20 U di inibitori di RNasi (PROMEGA) e 1 ng di XendoU purificata. Le miscele di reazione erano incubate con gli RNA substrati a 24°C per i tempi indicati. I prodotti delle reazioni erano analizzati su gel 6% poliacrilammide-7M urea.

Specificità del substrato

Gli oligoribonucleotidi

P1 (5'-GGAAACGUAUCCUUUGGGAG-3'),

P2 (5'-GGAAACGUAUCCUUGGGAGT-3'),

P3 (5'-GGAAACGUAUCCUCUGGGAG-3'),

P4 (5'-GGAAACGUAUCCUGUGGGAG-3')

erano marcati al 5': 10pmol di ciascun substrato sintetico era incubato a 37°C per 30 min, in presenza di 10 unità di Polinucleotide Chinasi (Roche), e 10µCi di (³²P) γATP. La reazione era terminata a 65°C per 5 min, gli inneschi erano purificati su gel 10% poliacrilammide 7M urea e incubati per 30min in presenza di ONE o di XendoU purificata come già descritto. L'RNA era estratto e analizzato su gel denaturante 10% poliacrilammide. L'RNA ladder era ottenuto per incubazione dell'oligo P4 (200.000 cpm) in 500mM NaHCO₃ a 90°C per 20min.

Analisi delle estremità 3' dei prodotti di taglio

Molecole I-1 marcate con ³²P e purificate da gel (I-1a e I-1b, generate dai tagli ai siti principali a e b a monte di U16, si veda lo schema di Fig.1A), ottenuti *in vitro* dopo incubazione dell' RNA 003 con ONE o con XendoU, o, in vivo, dopo microiniezione in oociti, erano incubati in 10 µl di 10 mM HCl a 25°C per 2 hr per aprire il fosfato ciclico come descritto da Forster (Forster *et al.*, 1990). Il fosfato era poi rimosso per incubazione del RNA in 50 mM Tris-HCl pH 8.5, 0.1mM EDTA in presenza di 1 U di Fosfatasi alcalina da intestino di vitello a 50°C per 60 min. L'enzima era inattivato per aggiunta di 1/10 di volume di 0.2M EGTA e la miscela riscaldata a 65°C per 10 min. L'RNA era estratto con fenolo/cloroformio e analizzato su gel 10% poliacrilammide-7M urea.

Isolamento del cDNA di XendoU

Una libreria di cDNA da embrioni di *X.laevis* allo stadio 28, costruita nel vettore λZAP II, era sondata con una sonda specifica

ING. BARZANO & ZANARDI ROMA S.p.A.



ottenuta per amplificazione per PCR su cDNA di *X.laevis* con gli oligonucleotidi degenerati (MAHs 5'-ATGGCICAYGAYTAYYTIGT-3' e IGTa 5'-ACIGGRTAIGCIGTICCIAT-3') disegnati sui peptidi ottenuti da digestione triptica di XendoU purificata.

Espressione del cDNA di XendoU in lisati di reticolociti

La sequenza con fase di lettura aperta di XendoU (ORF) era clonata nel vettore Blue Script e la proteina marcata con ³⁵(S)Metionina era prodotta per trascrizione e traduzione *in vitro* usando il kit TnT-coupled Reticulocyte Lysate System Kit (PROMEGA) in accordo con le istruzioni del produttore. Il prodotto di traduzione era analizzato su gel 10% SDS-PAGE.

Analisi di estensione da innesco

Il precursore contenente U86 trascritto *in vitro* era ottenuto da una reazione standard con T7, ma in presenza di 500 μM UTP non marcato. Il trascritto era iniettato in oociti di *X.laevis* o incubato con ONE o con XendoU purificata. Il prodotto di processamento I-4 era purificato da gel e retrotrascritto (SS preamplification system – GIBCO) con l'oligonucleotide marcato al terminale 5' UHindIII (5'-AAGCTTCTTCATGGCGGCTCGGCCAAT-3'), complementare ai 19 nucleotidi al terminale 3' dell'esone a valle. I prodotti elongati erano corsi in parallelo con la sequenza ottenuta con lo stesso innesco sul precursore contenente U86.

RISULTATI

Purificazione di XendoU da estratti nucleari di oociti di *X.laevis*

Gli autori hanno già sviluppato un sistema *in vitro* per riprodurre il rilascio dello snoRNA U16 dal suo introne ospite (Caffarelli *et al.*, 1994). Quando il precursore contenente U16 marcato con ^{32}P è incubato in un estratto nucleare di oociti di *X. laevis*, in presenza di ioni Mn^{++} , si ritrovano prodotti specifici, originati da tagli endonucleolitici (Fig. 1A and 1B): le molecole I-2 e I-1 derivano dal taglio a monte della regione codificante per U16, mentre le molecole I-3 e I-4 sono prodotte da taglio a valle di U16. Quando avviene un doppio taglio sulla stessa molecola di pre-mRNA, i prodotti pre-U16 si accumulano, per poi essere convertiti in snoRNA maturo per digestione esonucleotidica.

La procedura di caratterizzazione biochimica è indicata in Fig.1C, mentre il contenuto proteico delle frazioni con attività XendoU è mostrata in Fig. 1D. Dopo diversi passaggi cromatografici si otteneva una singola proteina di massa molecolare 37 kDa, come mostrato in Fig.1D, colonna 6. L'eluizione dell'attività XendoU durante l'ultimo passaggio di purificazione su colonna di gel filtrazione è consistente con una proteina monomerica di 37 kDa. Il saggio per verificare la presenza di attività XendoU era effettuato incubando il precursore contenente U16 marcato con ^{32}P con aliquote dei diversi passaggi di frazionamento. La Fig.1B mostra un raffronto dell'attività XendoU di estratti nucleari non frazionati (ONE) con quella della colonna di gel filtrazione (XendoU). Poiché è stata dimostrata la dipendenza dell'enzima da ioni Mn^{++} , questo cofattore è sempre presente nella reazione: in entrambi i casi si generano gli stessi prodotti di taglio primari, I-2 e I-3 e le loro molecole complementari, I-1 e I-4. L'analisi di

estensione da inneschi sui prodotti di taglio I-2 e I-4 ha rivelato che l'enzima purificato taglia le sequenze introniche nelle medesime zone ricche di U riconosciute *in vivo* (Caffarelli *et al.*, 1994).

Caratterizzazione del taglio XendoU

L'analisi della dipendenza ionica del taglio è stata effettuata incubando il precursore contenente U16 marcato con ^{32}P con ONE o con XendoU purificata in presenza di diversi cationi (Fig.2). In entrambi i casi Cd^{++} , Zn^{++} , Ni^{++} , Co^{++} e Pb^{++} non attivano il taglio; invece Mn^{++} , e con minore efficacia Mg^{++} , produce la comparsa degli specifici prodotti di taglio. Questi risultati indicano la dipendenza da ioni Mn^{++} per la piena attività di XendoU.

La selettività di substrato di XendoU è stata ulteriormente indagata incubando l'enzima purificato con l'oligoribonucleotide sintetico (P1), contenenti il sito di taglio distale di XendoU cleavage (sito d, Fig.1A), localizzato a monte di U16, e con i mutanti da esso derivati (P2 e P3). I risultati ottenuti, in Fig.3A, indicano che XendoU mostra la stessa selettività osservata *in vivo* e che la sequenza consenso minimale per il sito di taglio è un dimero di uracile.

L'incubazione dell'enzima con oligoribonucleotidi a doppia elica, di 21 nucleotidi, contenenti sequenze ricche in U ha dimostrato che solo gli RNA a singola elica sono riconosciuti da XendoU.

La chimica del taglio di XendoU è stata indagata determinando la natura chimica delle estremità dei prodotti di taglio. Si sono pertanto analizzati i terminali delle molecole I-1a e I-1b marcate con ^{32}P prodotte con ONE o con XendoU purificato: queste molecole erano purificate da

gel e trattate con fosfatasi alcalina, HCl, o entrambi. La Fig.3B mostra che si ottiene un leggero rallentamento nella migrazione, dovuta alla perdita di una carica negativa, quando il trattamento con fosfatasi alcalina segue quello con HCl (colonne 3). Questo risultato si ottiene sia con ONE (colonne ONE) che con XendoU purificato (colonne XendoU) e indica che l'estremità 3' delle molecole ha un gruppo fosfato presente in una forma ciclica 2'-3' (Lund and Dahlberg, 1992; Forster *et al.*, 1990). Infatti, solo dopo trattamento acido il gruppo fosfato può essere rimosso da fosfatasi, determinando il leggero ritardo elettroforetico. Questo effetto si osserva sia per le molecole I-1a e I-1b ottenute con estratti nucleari di oociti non frazionati, che con quelle ottenute con XendoU. Come già descritto (Caffarelli *et al.*, 1996), i prodotti di taglio primario come le molecole I-1, sono instabili *in vivo*, essendo, dopo il taglio, rapidamente degradate. Tuttavia, dopo tempi di incubazione molto brevi, è possibile purificare piccole quantità di molecole I-1b e sottoporle allo stesso trattamento descritto. La Fig.3B (colonne *in vivo*) indica che anche in questo caso si ottiene un leggero rallentamento nella migrazione (colonna 3), dimostrando che i prodotti della reazione *in vivo* evidenziano fosfati ciclici 2'-3'.

Isolamento del cDNA per XendoU

Dopo purificazione, i campioni proteici da SDS-PAGE sono stati ridotti, alchilati e digeriti con tripsina come riportato nella sezione sperimentale. La miscela di peptidi risultante era separata per R-HPLC e le frazioni di peptidi selezionate sottoposte a degradazione di Edman automatizzata. Le tre porzioni di sequenza determinate sono riportate

AS
VIA
QUINZ
& ZANNO
ROMA SPA



in Figura 4 (indicate come 1, 2 e 3). Da queste sequenze amminoacidiche, si derivavano oligonucleotidi degenerati, utilizzati in combinazioni diverse e in diversi orientamenti in reazioni di amplificazione PCR su cDNA da RNA polyA⁺ estratto da oociti di *X. laevis*. Solo la reazione con la sequenza 1 (forward) e 3 (reverse) dava un prodotto di amplificazione (500 bp). Il sequenziamento di questo prodotto indica la presenza di una fase di lettura aperta contenente il peptide 2. Questa sonda di cDNA era poi utilizzata per il sondaggio di una libreria di cDNA da embrioni di *X. laevis* allo stadio 28, che ha portato all'isolamento di un cDNA completo (Fig.4). La sequenza amminoacidica determinata è stata confermata da spettri MALDI-MS dei peptidi triptici. Infatti, i segnali osservati a m/z 565.29, 814.45, 1004.48, 10025.54, 1132.59, 1190.60, 1490.78, 1504.80, 1520.70, 1729.91, 1758.82, 1988.08, 2000.00, 2014.01, 2076.99, 2162.98, 2234.14, 2238.05, 2394.15, 2432.26, 3058.51 e 3370.66 erano attribuiti ai peptidi 196-200, 126-132, 117-124, 6-14, 117-125, 41-52, 114-125, 260-271, 15-26, 137-149, 53-67, 256-271, 53-69, 275-292, 204-220, 150-169, 133-149, 171-188, 170-188, 117-136, 6-31 e Ac4-31. Questo risultato ha permesso di coprire il 65% della sequenza intera, spiegando la resistenza del campione proteico da blot alla degradazione di Edman.

Clonazione e espressione del cDNA per XendoU

La ORF di XendoU, di 876 bp, è stata clonata nel vettore Blue Script e la proteina è stata prodotta mediante trascrizione e traduzione *in vitro* usando un lisato di reticolociti. Il prodotto di traduzione è stato

analizzato su SDS-PAGE evidenziando una proteina di massa molecolare di 37 kDa (Fig.5 A). Per verificare la natura della proteina da 37kDa, ne è stata saggiata l'attività enzimatica incubando l'RNA substrato, marcato con ^{32}P in lisato di reticolocita che esprime l'ORF per XendoU. Il saggio di attività è stato condotto in parallelo anche su un estratto non frazionato: la Fig.5B mostra che i prodotti di taglio generati dalla proteina tradotta (colonna ret-XendoU/+Mn) corrispondono esattamente a quelli ottenuti con l'estratto (colonne ONE). Inoltre, l'assenza di taglio quando gli ioni Mn^{++} non vengono aggiunti alla miscela di reazione (colonna ret-XendoU/- Mn) conferma la richiesta specifica dello ione e suggerisce che il legame al cofattore sia reversibile. Come controllo negativo il saggio di attività era effettuato incubando il substrato di RNA in lisato di reticolocita come tale, in presenza di ioni Mn^{++} (colonna ret/+Mn).

XendoU partecipa anche alla biosintesi dello snoRNA U86

Gli autori hanno già identificato uno snoRNA, U86, codificato da un introne del gene Nop56 di *X.laevis*. E' stato mostrato come U86 abbia omologhi nell'uomo, dove ha la stessa organizzazione genomica, e in lievito dove si trova nella ORF del gene Rib1 (Filippini *et al.*, 2001). Come lo snoRNA U16, anche U86 è contenuto in un introne che viene rimosso inefficientemente e la sua biosintesi sembra essere alternativa a quella del mRNA co-trascritto. L'iniezione del precursore contenente U86, marcato con ^{32}P , in oociti di *X.laevis* genera, mediante tagli a monte e a valle della regione codificante per U86, i prodotti tronchi I-2 e I-3 e le loro molecole complementari, I-1 e I-4 (Fig.6A, colonne *in vivo*).

Il processamento del precursore contenente U86 con XendoU purificata (Fig.6A, colonne XendoU) o con il lisato di reticolociti che esprime l'ORF di XendoU (Fig.6C, colonna ret-XendoU/+ Mn) dimostra che l'enzima è responsabile del taglio a valle della regione codificante U86. L'effettore del taglio a monte di U86, che produce le molecole I-2 e I-1, non è ancora noto e viene perso negli estratti nucleari di oociti (Fig.6A, colonne ONE). I siti di taglio di XendoU, a valle di U86, sono stati determinati per estensione da innescamento su molecole I-4 e corrispondono a due sequenze ricche in U (Fig.6B).

BIBLIOGRAFIA

Allmang, C., Kufel, J., Chanfreau, G., Mitchell, P., Petfalski E. and Tollervey, D. (1999) Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *EMBO J.* **18**, 5399-5410.

Ambros, V. (2001) Dicing up RNAs. *Science* **293**, 811-813

Bachellerie, J.P., Cavaillé, J. and Qu, L.H. (2000) Nucleotide modifications of eukaryotic rRNAs: the world of small nucleolar RNA guides revisited. *The Ribosome: structure, function, antibiotics, and cellular interactions*. (2000 ASM Press, Washington, D.C.) pp.191-203.

Bachmann, M., Messer, R., Trautmann, F. and Muller, W.E.G. (1984) 12S small nuclear ribonucleoprotein- associated acidic and pyrimidine-specific endoribonuclease from calf thymus and L5178y cells. *Biochim. Biophys. Acta* **783**, 89-99.

Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. and Hannon, G.J. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363-366.

Bujnicki, J.M., and Rychlewski, L. (2000) Prediction of a common fold for all four subunits of the yeast tRNA splicing endonuclease: implications for the evolution of the EndA/Sen family. *FEBS Lett.* **486**, 328-9.

Caffarelli, E., Losito, M., Giorgi, C., Fatica, A., and Bozzoni, I. (1998) In vivo identification of nuclear factors interacting with the conserved elements of box C/D small nucleolar RNAs. *Mol. Cell. Biol.* **2**, 1023-1028.

Caffarelli, E., Arese, M., Santoro, B., Fragapane, P., and Bozzoni, I. (1994) In vitro study of processing of the intron-encoded U16 small nucleolar RNA in *Xenopus laevis*. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 2966-2974

Caffarelli, E., Fatica, A., Prislei, S., De Gregorio, E., Fragapane, P., and Bozzoni, I. (1996) Processing of the intron-encoded U16 and U18 snoRNAs: the conserved c and D boxes control both the processing reactions and the stability of the mature snoRNA. *EMBO J.* **5**, 1121-1131.

Castano, J.G., Tobian, J.A., and Zasloff, M. (1985) Purification and characterization of an endonuclease from *Xenopus laevis* ovaries which accurately processes the 3' terminus of human pre-tRNA-Met(i) (3' pre-tRNase). *J. Biol. Chem.* **260**, 9002-9008

Chanfreau, G., Elela, S. A., Ares, M. Jr., and Guthrie, C. (1997) Alternative 3'-end processing of U5 snRNA by RNase III. *Genes Dev.* **11**, 2741-2751



ING. BARTOLO ZANARDI ROMA 2017

Chanfreau, G., Legrain, P., and Jacquier, A. (1998) Yeast RNase III as a key processing enzyme in small nucleolar RNAs metabolism. *J Mol Biol.* **284**, 975-88.

Cirino, N. M., Cameron, C.E., Smith, J.S., Rausch, J.W., Roth, M. J., Benkovic, S.J. and Le Grice, S.F. (1995) Divalent cation modulation of the ribonuclease functions of human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Biochemistry* **34**, 9936-9943.

Court, D. (1993)Rnase III: a double-strand processing enzyme. In: Brawerman, G.and Belasco, J , eds *Control of mRNA stability*. (New York, Academic, Press), pp.70-116.

Dange, V., Van Atta, R. B. and Hecht, S.M. (1990) A Mn²(+)-dependent ribozyme. *Science* **248**, 585-588.

Deutscher, M. P. (1985) E.coli RNAses: making sense of alphabet soup. *Cell* **40**, 731-732.

Deutscher, M. P. (1993) Ribonuclease multiplicity, diversity, and complexity.*J. Biol. Chem.* **268**, 13011-13014

Eder, P.S.and Walder, J.A. (1991) Ribonuclease H from K562 human erythroleukemia cells. Purification, characterization, and substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **266**, 6472-6479.

Elela,S.A., Igel,H., and Ares,M.Jr. (1996) Rnase III cleaves eukaryotic preribosomal RNA at a U3 snoRNP-dependent site. *Cell*, **85**, 115-124.

Filippini, D., Renzi, F., Bozzoni, I., and Caffarelli,E. (2001) U86, a novel snoRNA with an unprecedented gene organization in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **288**, 16-21

Forster, A.C., Davies, C., Hutchins, C.J. and Symons R.H. (1990) Characterization of self-cleavage of viroid and virusoid RNAs. *Methods Enzymol.* **181**, 583-607

Fragapane, P., Prislei, S., Michienzi, A., Caffarelli, E. and Bozzoni I. (1993) A novel small nucleolar RNA (U16) is encoded inside a ribosomal protein intron and originates by processing of the pre-mRNA. *EMBO J.* **12**, 2921-2928.

Freemont, P.S., Friedman, J.M., Beese, L.S., Sanderson M.R. and Steitz, T. A. (1988) Cocystal structure of an editing complex of Klenow fragment with DNA *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8924-8928.

Gandini-Attardi, D., Margarit, I. and Tocchini-Valentini, G.P. (1985) Structural alteration in mutant precursors of the yeast tRNA₃^{Leu} gene which behave as defective substrates for a highly purified splicing endoribonuclease. *EMBO J.* **4**, 3289-3297.

Gandini-Attardi, D., Baldi, I.M., Mattoccia, E., and Tocchini-Valentini G.P. (1990) Transfer RNA splicing endonuclease from *Xenopus laevis*. *Methods Enzymol.* **181**, 510-517.

Giorgi, C., Fatica, A., Nagel, R., and Bozzoni, I. (2001) Release of U18 snoRNA from its host intron requires interaction of Nop1p with the Rnt1p endonuclease. *EMBO J.* **20**, 6856-65.

Hirose, T., and Steitz J.A. (2001) Position within the host intron is critical for efficient processing of box C/D snoRNAs in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 12914-12919.

IN MEMORIAM
DR. GIORGIO ATTARDI
1938-2001

- Kazakov, S. and Altman, S. (1992) A trinucleotide can promote metal ion-dependent specific cleavage of RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 7939-7943.
- Kufel, J., Dichtl, B., and Tollervey, D. (1999) Yeast Rnt1p is required for cleavage of the pre-ribosomal RNA in the 3' ETS but not the 5' ETS. *RNA* **5**, 909-917
- Lygerou, Z., Allmang, C., Tollervey, D., and Séraphin, B. (1996) Accurate processing of a eukaryotic precursor ribosomal RNA by ribonuclease MRP in vitro. *Science* **272**, 268-270
- Lund, E. and Dahlberg J.E. (1992) Cyclic 2',3'-phosphates and nontemplated nucleotides at the 3' end of spliceosomal U6 small nuclear RNA's. *Science* **255**, 327-330
- Maxwell, E.S. and Fournier, M.J. (1995) The small nucleolar RNAs. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 897-934
- McDowall, K.J., Kaberdin, V.R., Wu, S.W., Cohen, S.N. and Lin-Chao, S. (1995) Site specific RNase E cleavage of oligonucleotides and inhibition by stem-loops. *Nature* **374**, 287-290
- Nashimoto, M., (1995) Conversion of mammalian tRNA 3' processing endoribonuclease to four-base-recognizing RNA cutters. *Nucl. Acids Res.* **23**, 3642-3647
- Nicholson, A.W. (1997) in *Ribonucleases: structures and functions*, eds. D'Alessio, G. and Riordan, J.F. (Academic New York), pp. 1-49
- Pan, T., Long, D. M. and Uhlenbeck, O.C. (1993) The RNA World, ed. R.F. Gesteland and J.F. Atkins, CSHL Press, 271-302.

Peebles, C. L., Gegenheimer, P., and Abelson, J. (1983) Precise excision of intervening sequences from precursor tRNAs by a membrane-associated yeast endonuclease. *Cell* **32**, 525-536.



Prisley, S., Sperandio, S., Fragapane, P., Caffarelli, E., Presutti, C. and Bozzoni, I. (1992) The mechanisms controlling ribosomal protein L1 pre-mRNA splicing are maintained in evolution and rely on conserved intron sequences. *Nucl. Acids Res.* **17**, 4473-4479

Prisley, S., Fatica, A., De Gregorio, E., Arese, M., Fragapane, P., Caffarelli, E., Presutti, C. and Bozzoni, I. (1995) Self-cleaving motifs are found in close proximity to the sites utilized for U16 snoRNA processing. *Gene* **163**, 221-226.

Rauhut, R., Green, P.R., and Abelson, J. (1990). Yeast tRNA-splicing endonuclease is a heterotrimeric enzyme. *J. Biol. Chem.* **265**, 18180-18184.

Schoenberg, D.R., and Chernokalskaya, E. (1997) Ribonucleases involved in eukaryotic mRNA turnover. p. 217-240. In J. Harford and D. R. Morris (ed.), mRNA metabolism and post-transcriptional gene regulation. Wiley, new york; N. Y.

Steitz, J. A. and Steitz, T. A. (1993) A general two-metal-ion mechanism for catalytic RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 6498-6502.

Trotta, C.R., Miao, F., Arn, E.A., Stevens, S.W., Ho, C.K., Rauhut, R., and Abelson, J.N. (1997) The yeast tRNA splicing endonuclease: a tetrameric enzyme with two active site subunits homologous to the archaeal tRNA endonucleases. *Cell* **89**, 849-58

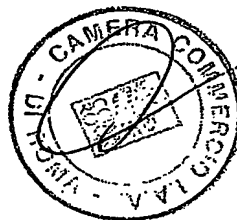
ING. ARMANDO ZANARDI ROMA SP.

Watkins, N.J., Segault, V., Charpentier, B., Nottrott, S., Fabrizio, P., Bachi, A., Wilm, M., Rosbash, M., Branlant, C., and Luhrmann, R. (2000) A common core RNP structure shared between the small

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)

dgacpasso

WITNESSES:



RIVENDICAZIONI

1. Acido nucleico codificante una proteina ad attività endoribonucleasica in cui detta proteina ad attività endoribonucleasica è caratterizzata dal fatto di essere specifica per sequenze poliU, dipendente da ioni Mn^{++} , e di rilasciare come prodotti del taglio molecole di RNA con estremità 5' OH e 2'-3' fosfato ciclici.
2. Acido nucleico secondo la rivendicazione 1 comprendente sostanzialmente la sequenza nucleotidica della fig. 4, o omologhi funzionali di essa o una sequenza complementare ad essa.
3. Vettore ricombinante in grado di esprimere in maniera efficace in procarioti l'acido nucleico secondo le rivendicazioni 1 o 2.
4. Vettore ricombinante in grado di esprimere in maniera efficace in eucarioti l'acido nucleico secondo le rivendicazioni 1 o 2.
5. Proteina ad attività endoribonucleasica che sia specifica per sequenze poli U, dipendente da ioni Mn^{++} , e che rilasci come prodotti del taglio molecole di RNA con terminali 5' OH e 2'-3' fosfato ciclici, o porzioni funzionali dei essa.
6. Proteina secondo la rivendicazione 5 codificata dall'acido nucleico secondo le rivendicazioni 1 o 2.
7. Proteina secondo la rivendicazione 6 avente sostanzialmente la sequenza amminoacidica di Fig.4.

Roma, - 8 LUG. 2002

p.p.: Università degli Studi Roma "La Sapienza"

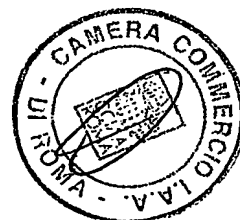
Consiglio Nazionale delle Ricerche

ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

Olga Capasso

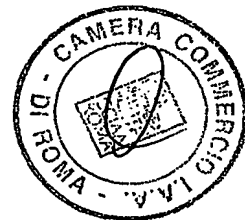
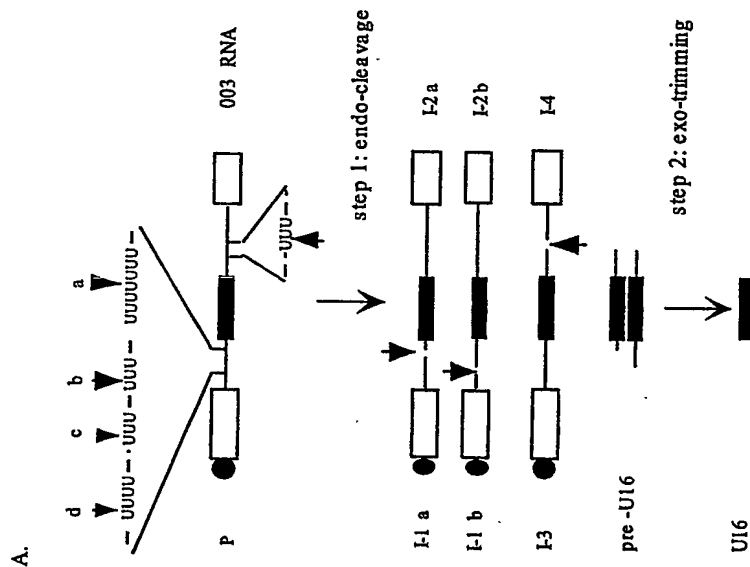
UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)

OC



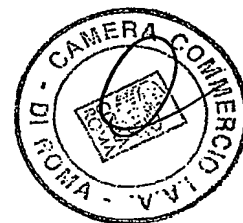
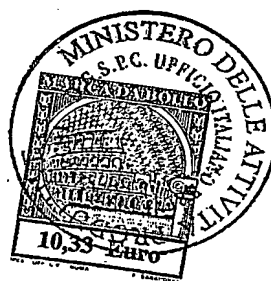
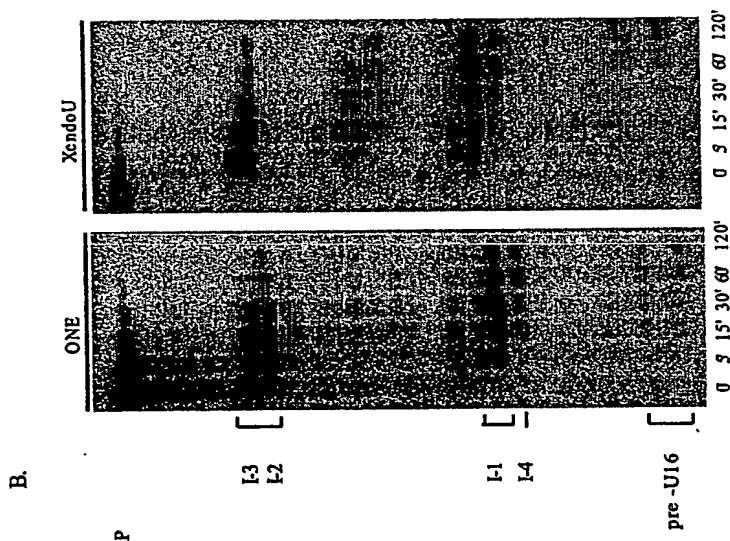
RM 2002 A 000365

Fig. 1A



RM 2002 A 000365

Fig. 1B



p.p.: UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "LA SAPIENZA" e CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

descanso

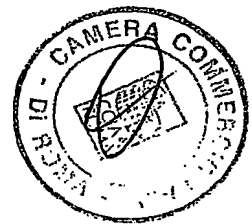
UN MANDATARIO
per se e per gli altri

Fig. 1C

C.

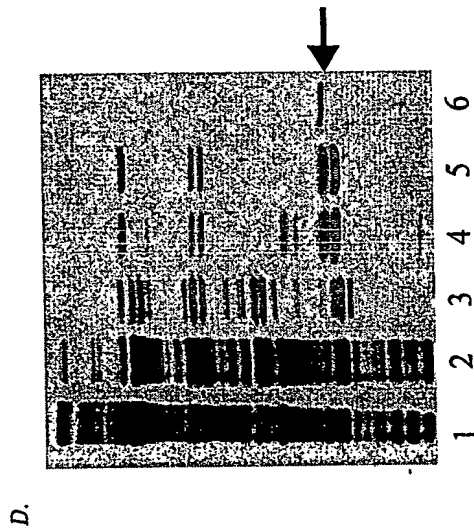
(ONE)

- 1) X. laevis oocyte nuclear extract
- 2) Ammonium sulphate fractionation
- 3) Hydroxylapatite chromatography
- 4) Blue sepharose chromatography
- 5) Hydroxylapatite chromatography
- 6) Gel filtration chromatography



RM-2002 A 000365

Fig. 1D



D.

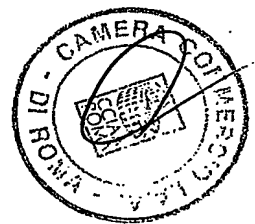
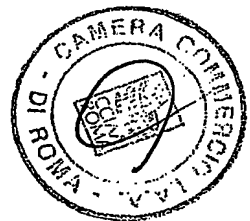
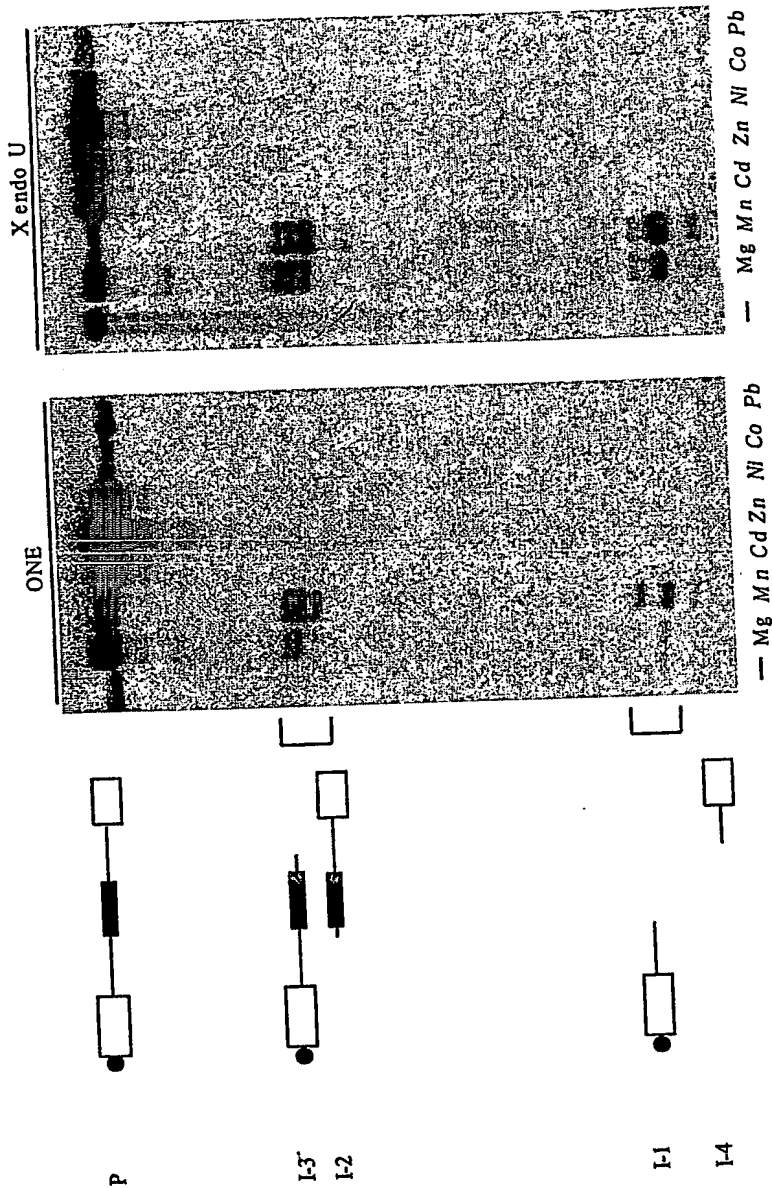


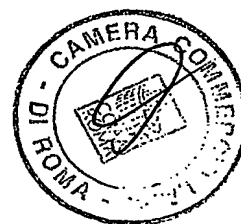
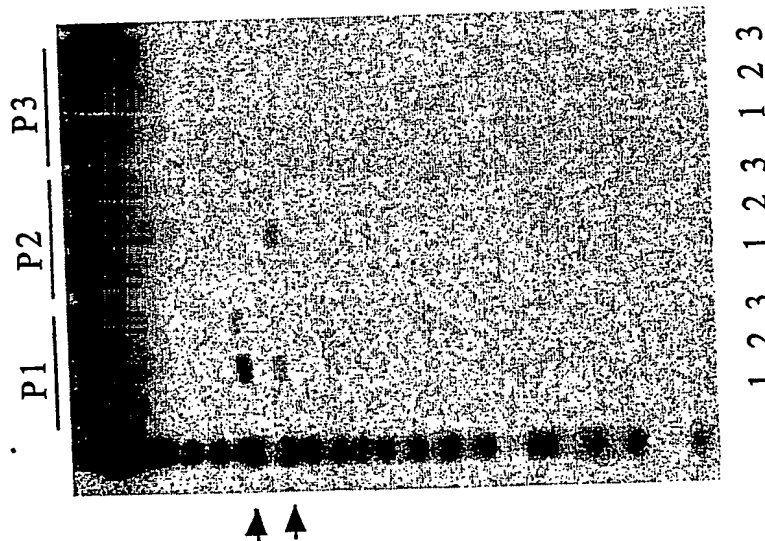
Fig. 2



RM 2002 A 00065

Fig. 3A

P1 5'-GGAAACGUAUCCUUUGGAG-3'
 P2 5'-GGAAACGUAUCCUUUGGAG-3'
 P3 5'-GGAAACGUAUCCUCUGGAT-3'



A.

p.p.: UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "LA SAPIENZA" e CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE
 ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

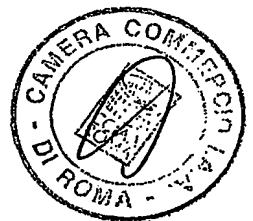
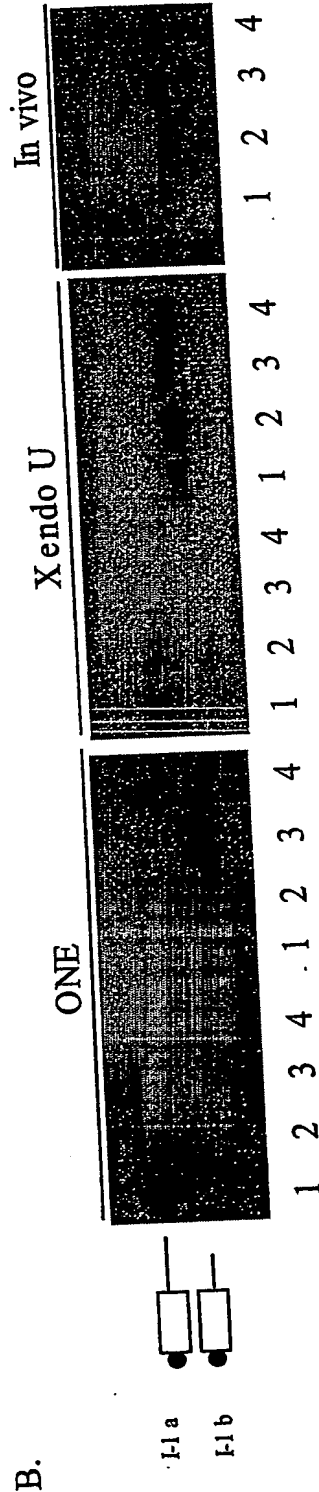
Olga Capasso

UN MANDATARIO
 per se e per gli altri
 Olga Capasso

7/13

RM 2002 A 0.00365

Fig. 3B



Olga Capasso

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso

Fig. 4

[illegible]

N H P D L Y *

— 2 — *Amesbury, Mass., Nov. 16, 1891.*

[illegible]

Abstract

THE

३३

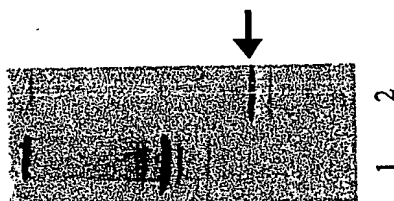


descargado

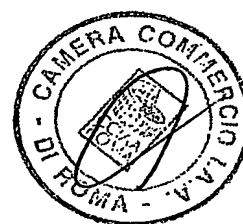
9/13

RM 2002 A 00365

Fig. 5A



A.



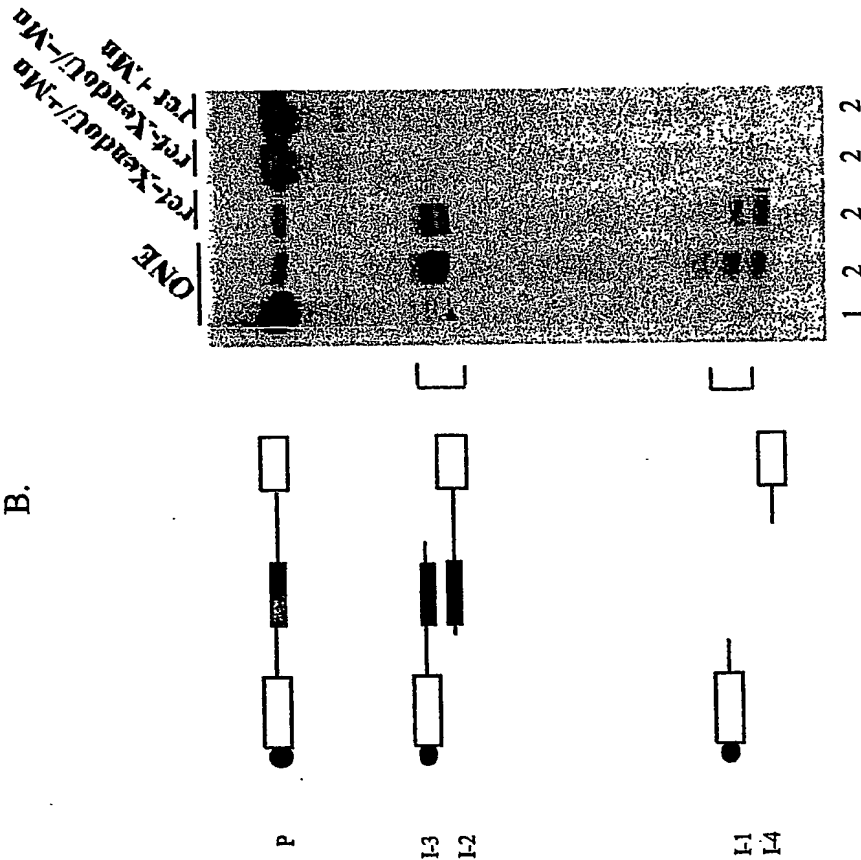
p.p.: UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "LA SAPIENZA" e CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

Olga Canasso

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Canasso

RM 2002 A 000365

Fig. 5B

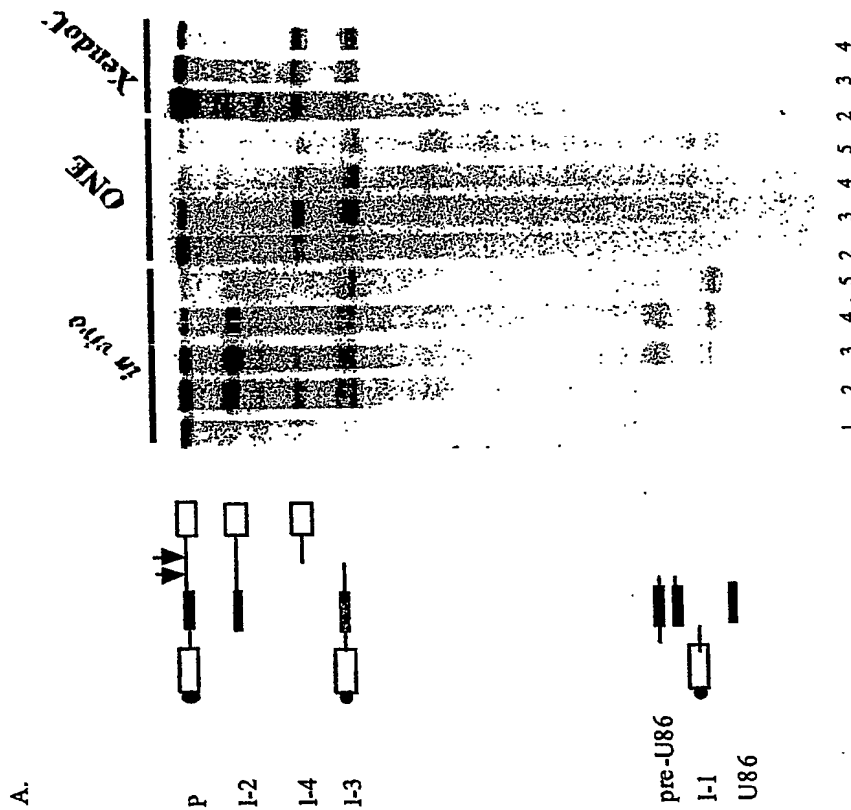


Olga Capasso

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso

RM 2002 A 000365

Fig. 6A



A.



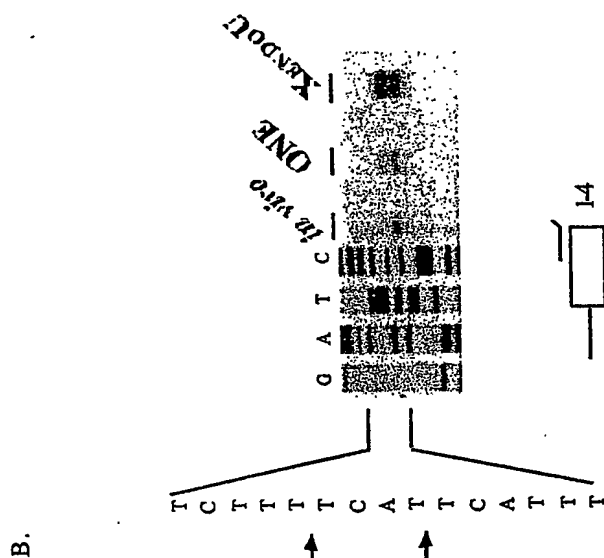
Olga Capasso

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso

12/13

RM 2002 A 00365

Fig. 6B



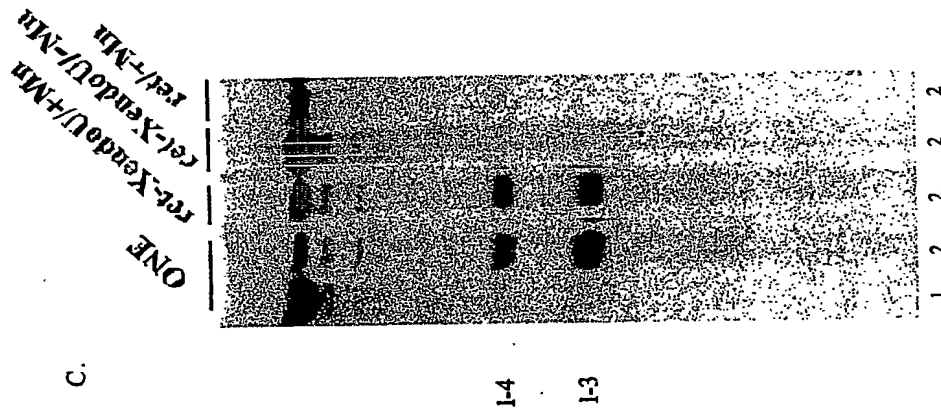
p.p.: UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "LA SAPIENZA" e CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

Olga Capasso

per se e per gli altri
Olga Capasso
ATO 2/11/2002 000000

RM 2002 A 00365

Fig-6C



1-4 1-3



alqo capasso